



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA FRONTEIRA SUL**  
**CAMPUS CHAPECÓ**  
**CURSO DE AGRONOMIA**

**CARACTERIZAÇÃO DE LEVEDURAS ISOLADAS DE CERVEJA TIPO LAMBIC**

**SABRINA APARECIDA PORT**

**CHAPECÓ**  
**2017**

**SABRINA APARECIDA PORT**

**CARACTERIZAÇÃO DE LEVEDURAS ISOLADAS DE CERVEJA TIPO LAMBIC**

Trabalho de conclusão de curso de graduação apresentado como requisito para obtenção de grau de Bacharel em Agronomia com ênfase em Agroecologia da Universidade Federal da Fronteira Sul.

Orientador: Prof. Dr. Sérgio Luiz Alves Jr.  
Coorientador: Me. Junior Romeo Deoti.

**CHAPECÓ**

**2017**

**PROGRAD/DBIB - Divisão de Bibliotecas**

PORT, SABRINA APARECIDA  
CARACTERIZAÇÃO DE LEVEDURAS ISOLADAS DE CERVEJA TIPO  
LAMBIC/ SABRINA APARECIDA PORT. -- 2017.  
40 f.:il.

Orientador: Dr. Sérgio Luiz Alves Jr.  
Co-orientador: Me. Junior Romeo Deoti.  
Trabalho de conclusão de curso (graduação) -  
Universidade Federal da Fronteira Sul, Curso de  
Agronomia , , 2017.

1. Fermentação. 2. Maltose. 3. Maltotriose. 4.  
Candida. 5. Brettanomyces. I. Jr, Dr. Sérgio Luiz Alves,  
orient. II. Deoti, Me. Junior Romeo, co-orient. III.  
Universidade Federal da Fronteira Sul. IV. Título.

**SABRINA APARECIDA PORT**

**CARACTERIZAÇÃO DE LEVEDURAS ISOLADAS DE CERVEJA TIPO LAMBIC**

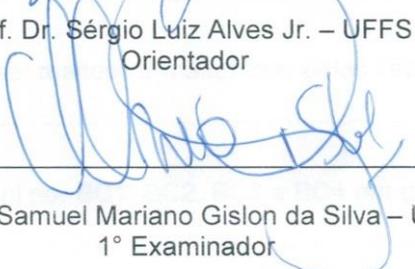
Trabalho de conclusão de curso de graduação apresentado como requisito para obtenção de grau de Bacharel em Agronomia da Universidade Federal da Fronteira sul.

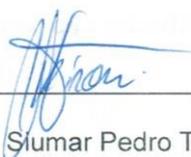
Orientador: Prof. Dr. Sérgio Luiz Alves Jr.  
Coorientador: Me. Junior Romeo Deoti.

Este trabalho de conclusão de curso foi defendido e aprovado pela banca em:  
15 / 12 / 2017

**BANCA EXAMINADORA**

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Sérgio Luiz Alves Jr. – UFFS  
Orientador

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Samuel Mariano Gislon da Silva – UFFS  
1º Examinador

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Siumar Pedro Tironi – UFFS  
2º Examinador

## **AGRADECIMENTOS**

Aos meus pais e a minha irmã que estiveram ao meu lado em todo esse ciclo que está se encerrando. Pelo apoio incondicional, carinho e amor;

Aos meus orientadores pela paciência e o conhecimento construído, aprendi muito nesses últimos meses, muito obrigada;

Aos meus colegas de laboratório, pelo companheirismo e ajuda, além da amizade que construímos nesses últimos meses;

Aos técnicos de laboratório pelo suporte recebido;

Aos meus amigos pelo apoio moral e cervejas necessitadas durante esse caminho que percorri;

Ao laboratório LEVTECK pelas leveduras enviadas, sem elas essa pesquisa não teria acontecido...

E ao Boris pelo material fornecido.

## RESUMO

A fermentação espontânea foi a responsável pela origem da cerveja; dessa forma surgem as cervejas do tipo Lambic. A produção de cerveja artesanal no Brasil tem crescido, e a compra e o uso de leveduras também. Com base nisso, pesquisas com leveduras de fermentação alcoólica espontânea podem oferecer aos produtores novas opções de cepas de leveduras. A partir disso, o objetivo desse trabalho foi analisar a performance fermentativa de leveduras encontradas em diferentes estágios de um processo de fermentação espontânea. Dessa forma, foram analisadas oito linhagens de leveduras selvagens (isoladas de um processo de fermentação espontânea) e duas linhagens industriais. Entre essas leveduras, quatro pertencem à espécie *Candida glabrata*, cinco à espécie *Brettanomyces bruxellensis* e uma à *Saccharomyces pastorianus*. Foram realizados cultivos celulares para avaliar o crescimento das leveduras, o consumo dos três carboidratos majoritariamente encontrados no mosto cervejeiro (glicose, maltose e maltotriose) e a produção de etanol e ácido acético, além de uma RAPD-PCR a partir do genoma das linhagens utilizadas. A metodologia RAPD empregada foi insuficiente para diferenciar leveduras encontradas na produção de cerveja do tipo Lambic. As cepas *Candida glabrata* foram incapazes de consumir maltose e maltotriose, enquanto a glicose foi eficientemente fermentada. As cepas de *Brettanomyces bruxellensis* apresentaram metabolismo mais diversificado: enquanto uma parcela apresentou crescimento lento e tardio em glicose, outra foi capaz de metabolizar por completo essa hexose no primeiro dia de incubação. Com exceção de uma linhagem de *B. bruxellensis*, que consumiu mais de 95% da maltose e da maltotriose disponíveis no meio, todas as demais tiveram dificuldade de metabolizar esses dois  $\alpha$ -glicosídeos. As cepas de *B. bruxellensis* que consumiram os carboidratos disponíveis no meio de cultura produziram em média 3,8 g L<sup>-1</sup> de etanol. A produção de ácido acético foi detectada em duas linhagens de *C. glabrata* e em três linhagens de *B. bruxellensis*, tendo uma delas produzido entre 4,18 e 4,78 g L<sup>-1</sup> nos meios com os três carboidratos analisados. A levedura da espécie *S. pastorianus*, por sua vez, fermentou os três carboidratos, gerando em média 5,8 g L<sup>-1</sup> de etanol. Os dados sugerem que a maior parte das leveduras isoladas do processo de fermentação espontânea dificilmente seriam capazes de produzir, sozinhas, uma cerveja com as características organolépticas adequadas, haja vista a baixa performance fermentativa diante da maltose e da maltotriose.

Palavras-chave: Fermentação, Maltose, Maltotriose, *Candida*, *Brettanomyces*.

## ABSTRACT

The spontaneous fermentation was responsible for the origin of the beer; in this way the Lambic beers had arisen. The production of craft beer in Brazil has grown, and the purchase and use of yeasts as well. Based on this, the researches on yeast from spontaneous alcoholic fermentation may offer producers new yeast strains options. So, the objective of this work was to analyze the fermentative performance of yeasts found in different stages of a spontaneous fermentation process. For this, eight wild yeast strains (isolated from a spontaneous fermentation process) and two industrial strains were analyzed. Among these yeasts, four belonging to the species *Candida glabrata*, five to the species *Brettanomyces bruxellensis* and one to *Saccharomyces pastorianus*. Cell cultures were used to evaluate yeast growth, consumption of the three carbohydrates mostly found in the brewing wort (glucose, maltose and maltotriose) and the production of ethanol and acetic acid, in addition to a RAPD-PCR from the genome of the analyzed strains. The RAPD methodology used was insufficient to differentiate yeasts found in Lambic beer production. *Candida glabrata* strains were unable to consume maltose and maltotriose while glucose was efficiently fermented. The *Brettanomyces bruxellensis* strains showed more diversified metabolism: while some of them presented slow and late growth in glucose, others were able to completely metabolize this hexose at the first day of incubation. With the exception of one strain of *B. bruxellensis*, which consumed more than 95% of the available maltose and maltotriose in the medium, all others had difficulty in metabolizing these two  $\alpha$ -glycosides. *B. bruxellensis* strains that consumed the available carbohydrates in the culture medium produced on average 3.8 g L<sup>-1</sup> of ethanol. The production of acetic acid was detected in two lines of *C. glabrata* and three strains of *B. bruxellensis*, one of which produced between 4.18 and 4.78 g L<sup>-1</sup> in the media with the three carbohydrates analyzed. The yeast species *S. pastorianus*, on the other hand, fermented the three carbohydrates, generating an average of 5.8 g L<sup>-1</sup> of ethanol. The data suggest that most of the yeasts isolated from the spontaneous fermentation process would hardly be able to produce, on their own, a beer with the appropriate organoleptic characteristics, given the poor fermentative performance on maltose and maltotriose.

Key words: Fermentation, Maltose, Maltotriose, *Candida*, *Brettanomyces*.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Árvore filogenética de algumas espécies de leveduras relacionadas à <i>Candida glabrata</i> .....	14
Figura 2: Resultado obtido com análise de RAPD-PCR com o primer (GTG) <sub>5</sub> . (1) BC3, (2) BC4 (isoladas no fim da fermentação), (3) 3C2, (4) 4C1 (isoladas no início da fermentação), (5) <i>S. cerevisiae</i> de cervejaria, (6) W-34/70, (7) PE-2 (cepa de <i>S. cerevisiae</i> utilizada na produção de etanol combustível), (M) marcador de tamanho molecular.....	21
Figura 3: Crescimento em glicose, maltose e maltotriose das cepas 3C2, 3C3, 4C1 e 4C5.....	23
Figura 4: Consumo de glicose, maltose e maltotriose pelas cepas 3C3, 3C8, 4C1 e 4C5.....	24
Figura 5: Produção de etanol das cepas 3C2, 3C8, 4C1 e 4C5 em glicose, maltose e maltotriose.....	25
Figura 6: Crescimento de BC1, BC2, BC3 e BC4 em glicose, maltose e maltotriose. ....	28
Figura 7: Consumo de glicose, maltose e maltotriose pelas cepas BC1, BC2, BC3 e BC4.....	29
Figura 8: Produção de etanol por BC1, BC2, BC3 e BC4 em glicose, maltose e maltotriose.....	30
Figura 9: Crescimento (A), consumo de carboidratos (B) e produção de etanol (C) por <i>B. bruxellensis</i> (industrial). ....	31
Figura 10: Crescimento (A), consumo de carboidratos (B) e produção de etanol (C) da cepa W34/70.....	33

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Produção de ácido acético a partir de diferentes carboidratos por todas as leveduras testadas. ....	35
---	----

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>9</b>
<b>1.1</b>	<b>OBJETIVO GERAL</b> .....	<b>10</b>
<b>1.2</b>	<b>OBJETIVO ESPECÍFICO</b> .....	<b>10</b>
<b>2</b>	<b>REFERENCIAL TEÓRICO</b> .....	<b>11</b>
2.1	PRODUÇÃO E CONSUMO DE CERVEJA NO PASSADO .....	11
2.2	FERMENTAÇÃO ESPONTÂNEA .....	12
2.3	METABOLISMO DE CARBOIDRATOS .....	13
2.4	LEVEDURAS <i>Candida glabrata</i> .....	14
2.5	LEVEDURAS <i>Brettanomyces</i> .....	15
2.5.1	Compostos de aroma e sabor na cerveja Lambic .....	16
2.6	ANÁLISE DE LEVEDURAS DAS CERVEJAS LAMBIC .....	16
<b>3</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>18</b>
3.2	LEVEDURAS UTILIZADAS.....	18
3.3	CONDIÇÕES DE CULTIVO E CRESCIMENTO CELULAR.....	18
3.4	DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE CARBOIDRATOS, E ETANOL.....	19
3.5	RAPD-PCR.....	19
<b>4</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÕES</b> .....	<b>20</b>
4.1	IDENTIFICAÇÃO TAXÔNOMICA .....	20
4.2	CRESCIMENTO, CONSUMO DE CARBOIDRATOS E PRODUÇÃO DE ETANOL... 22	
4.2.1	Fermentação alcoólica de <i>Candida glabrata</i> .....	22
4.2.2	Fermentação alcoólica de <i>Brettanomyces bruxellensis</i> .....	26
4.2.3	Fermentação alcoólica de <i>Saccharomyces pastorianus</i> (W-34/70) .....	32
4.2.4	Produção de ácido acético.....	34
<b>5</b>	<b>CONCLUSÕES</b> .....	<b>36</b>
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>38</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A agricultura e a primeira forma de fermentação do mundo nasceram quase juntas. Há mais de 13.000 anos, a espécie humana deixou de ser nômade, caçar animais em diferentes lugares, e aprendeu a domesticar plantas e animais, iniciando ali uma civilização. Segundo BRAIDWOOD et al. (2012), a responsável por essa alteração da maneira de vida humana foi a cerveja. Eles tinham problemas ao plantar e colher. Era muito trabalho para pouca recompensa, e quando da descoberta de que a massagem de grãos fermentáveis resultaria em uma bebida palatável e nutritiva, os homens passaram a domesticar plantas e se organizarem em grupos. O grão cru não é solúvel, porém pode ser cozido, além do fato de, se deixado a luz do sol, poder passar por um certo início de fermentação. Os Sumérios produziam pães de cevada, no entanto estes eram duros demais para o consumo; assim, a receita mais antiga do mundo pode ser chamada de “baking-and-brewing” (JACKSON, 1997).

O tipo de cerveja que até hoje é produzida de forma espontânea, ou seja, sem inoculação de culturas puras de leveduras, é chamada de Lambic. Essa cerveja originalmente é produzida na Bélgica, e uma de suas características é a adição ou não de frutas na fermentação. Normalmente a fermentação ocorre em barris de madeira do qual carregam microrganismos que ajudam nas etapas da fermentação. Esse estilo de cerveja tem datas registradas desde o século XIV, porém foi em 1960 e 1970 que a cerveja recebeu um conceito: cerveja feita com no mínimo 30% de trigo não maltado, fermentação espontânea e certos níveis de acidez. A Lambic se tornou o principal estilo de cerveja consumido entre 1750 e a I Guerra Mundial, e ainda hoje ela é uma das especialidades de alguns Cafés na Bélgica. A maneira de produção e suas características peculiares conquistaram algumas cervejarias ao redor do mundo: países como França, Holanda, Inglaterra e Estados Unidos, passaram a produzir algumas cervejas advindas de fermentações espontâneas, ou até mesmo, utilizar as leveduras selvagens encontradas na fermentação espontânea (JACKSON, 1997).

Segundo a CERVBRAIL (Associação Brasileira da Indústria da Cerveja), o setor cervejeiro no Brasil tem uma produção de 14 bilhões de litros/ano – que movimentou em torno de R\$ 77 bilhões em 2016. A produção cresceu em torno de 5% ao ano nos últimos 10 anos. Segundo a Euromonitor (Centro de pesquisa e

análises de consumo mundial) o consumo de cerveja no Brasil em 2017 foi de 60,7 litros por pessoa/ano, um volume baixo em comparação com a República Tcheca que tem um consumo de 143 litros por pessoa/ano. Apesar do baixo consumo em comparação com outros países, o mercado cervejeiro no Brasil representa 1,6% do PIB nacional.

No Brasil, especialmente nos últimos anos, a produção de cerveja artesanal vem se tornando cada vez mais popular, e, além dela, vem crescendo também a chamada produção de quintal, entre amigos e durante o fim de semana. Essa forma de produzir cerveja faz com que mais dinheiro seja injetado na economia além de melhorar o convívio social. Esses produtores artesanais utilizam normalmente leveduras oferecidas pelo mercado, do qual acabam se limitando a uma produção pobre, com poucas opções de cepas. Por isso, com pesquisas mais aprofundadas em leveduras de mosto cervejeiro, principalmente sobre as isoladas de fermentações espontâneas, as pessoas poderiam fazer o uso de cepas diferenciadas, assim produzindo uma cerveja artesanal com características organolépticas que se deseja, ou seja, fora do padrão comercial.

### 1.1 OBJETIVO GERAL

Caracterização de leveduras encontradas em diferentes estágios de um processo de fermentação espontânea para produção de cerveja do tipo Lambic.

### 1.2 OBJETIVO ESPECÍFICO

- Caracterizar os perfis de crescimento celular
- Caracterizar os perfis de consumo de maltose, maltotriose e glicose;
- Caracterizar os perfis de produção de etanol e ácido acético;
- Agrupar as leveduras de acordo com seu grau de parentesco por meio de RAPD.

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 PRODUÇÃO E CONSUMO DE CERVEJA NO PASSADO

A cerveja é considerada, ao lado do vinho, uma das mais antigas bebidas do mundo. Ao fim da era do gelo, os nômades passaram a cultivar e a domesticar grãos de cereais (GRETTON, 1929). Com o aumento de pessoas na comunidade, eles trocaram a vida de viajantes para plantar e estocar alimento. Os grãos majoritariamente cultivados eram de trigo, cevada e einkorn (um tipo antigo de trigo, cultivado no mediterrâneo na época). Apesar de alguns indícios apontarem a criação da cerveja entre 10 e 7 mil anos atrás no Egito, há registros de que na China tenha ocorrido a primeira fermentação alcoólica por grão. Lá foram encontrados vasos com misturas de arroz, mel e frutas com evidências de serem do 4º ou 5º milênio a.C (HORNSEY, 2003). Os grãos armazenados apresentam uma rica fonte de carboidratos e proteínas, e adicionados a fatores de umidade e a leveduras selvagens do ar, acaba ocorrendo uma fermentação alcoólica espontânea. Apesar disso, para que essa fermentação pudesse ser chamada de cerveja, encontravam-se dois problemas: o amido deveria de alguma forma ser convertido em mono, di ou trissacarídeos e leveduras não poderiam se estabelecer ao redor do grão, pois isso poderia acarretar em desenvolvimento de hifas e perda do grão (RABIE, 1997). Com isso as leveduras deveriam vir de uma outra fonte. Frutas como uvas e tâmaras ofereciam, em suas cascas, leveduras selvagens necessárias para a fermentação. Para a conversão do amido em glicídios, eram adicionados sucos, mel ou microrganismos capazes de transformar o amido para garantir a fermentação (MEUSSDOERFFER, 2009).

A cerveja sempre esteve na vida do homem; ela foi usada como bebida de cerimônias religiosas (Síria), oferecida aos Deuses e usada para tratar doenças (Egito) (MICHEIAND; MCGOVERN; BADIÉ, 2003). Na idade média, a cerveja se tornou ainda mais ingerida que a própria água. Devido ao fato de ser nutritiva, ela era muito consumida, o que ajudava na realização dos afazeres que exigiam muita força física. Ainda na idade média, com o envolvimento da igreja católica, o processo de fermentação se tornou uma forma de renda para as igrejas, que se tornaram uma das maiores produtoras da bebida (MEUSSDOERFFER, 2009). O lúpulo foi introduzido no processo de fermentação apenas no século IX, apesar de já terem

relatos de uso de ervas além da *Cannabis sativa* quando os mosteiros produziam (usado para curar dores de cabeça). Algum tempo depois, em 1516, foi criada a lei da pureza, certificando uma produção de cerveja de qualidade. Ela é seguida até hoje na Alemanha. Suas especificações são de que a cerveja deve conter apenas 4 ingredientes: malte, lúpulo, água e levedura. Enfim, no século XIX com a descoberta do papel da levedura na fermentação, por Louis Pasteur, e com o primeiro uso de culturas puras de levedura em 1883, realizado por Emil Hansen, a produção cervejeira tomou outras proporções (JACKSON, 1997).

## 2.2 FERMENTAÇÃO ESPONTÂNEA

No início da produção da cerveja Lambic, os cervejeiros não tinham conhecimento de que, quando o mosto da cerveja baixava a temperatura, ela acabava atraindo leveduras e bactérias do ar. Com o passar dos anos, os produtores descobriram de forma empírica que as cascas de frutas carregavam leveduras selvagens e ao serem adicionadas ao mosto ocorria o consumo dos carboidratos oriundos da hidrólise do amido do malte. Dessa forma, surgem as cervejas do tipo Lambic (JACKSON, 1997).

A família das cervejas Lambic representa a mais antiga forma de fermentação cervejeira da história, e ainda é adotada em cervejarias ao redor do globo. Ela foi criada no vale do rio Senne, na Bélgica (JACKSON, 1997). Sabendo que sua fermentação é espontânea, quase todo o tipo de microrganismo poderá ser encontrado nela (VAN OEVELEN et al., 1997). Esse tipo de cerveja é o único ainda produzido com leveduras selvagens. Com até 30% de trigo não maltado, a lambic tradicionalmente é fermentada em barris de madeira, no qual microrganismos encontrados na madeira também influenciam na sequência da fermentação (JACKSON, 1997). Tradicionalmente, esse tipo de cerveja ainda é produzido perto do rio Senne em Bruxelas. Nesse local, estima-se, encontra-se o ambiente e os microrganismos necessários para a fermentação. Segundo a tradição, ela deve ser apenas produzida nessa região, porque em outros lugares a bebida não se tornaria uma autêntica cerveja Lambic, além de a fermentação não ocorrer da forma tradicional (VERACHTERT; ISERENTANT, 1995).

A principal diferença da Lambic para outras cervejas é a não inoculação de culturas puras de leveduras. Para isso, o mosto cozido é deixado de um dia para

outro em um recipiente aberto. Este deverá atingir em torno dos 20°C, e é nessa fase que ocorre o crescimento de bactérias. No outro dia, ocorre a inoculação espontânea de microrganismos encontrados no ambiente do vale do rio Senne. Então, o mosto é transferido para os barris de madeira onde serão estocados em temperaturas que variam entre 0 e 25°C (VAN OEVELEN et al.,1997). Enfim, a fermentação ainda irá durar no mínimo 2 anos até a sua apreciação pelo consumidor (VERACHTERT; ISERENTANT, 1995).

Uma fermentação espontânea apresenta vários estágios de crescimento microbiológico. Pode-se considerar, nesse caso da fermentação da cerveja lambic, cinco diferentes fases. Na primeira delas (fase de Enterobactérias), ocorre o crescimento e desenvolvimento de bactérias como *Enterobacter cloacae* e *Klebsiella aerogenes*, além de leveduras que não fazem assimilação de maltose. Em razão de fatores como atividade metabólica e o abaixamento do pH, leveduras e bactérias acabam morrendo, dando início, depois de um mês, à segunda fase (fase de crescimento de leveduras *Saccharomyces*). Nessa fase, se desenvolvem as espécies *S. cerevisiae*, *S. bayanus*, *S. uvarum* e *S. inusitatus*, sendo elas as principais responsáveis pela produção de etanol. A terceira fase é a fase de acidificação; após 4 meses, bactérias pertencentes ao gênero *Pedococcus* e produtoras de ácido láctico se desenvolvem. Durante algumas etapas, o gênero *Lactobacillus* também aparece. Então, devido à atividade metabólica, ao consumo dos carboidratos à acidificação do mosto, as leveduras do gênero *Saccharomyces* acabam sendo eliminadas e surgem leveduras *Brettanomyces*. Espécies como *B. bruxellensis*, *B. lambicus*, *B. custerti*, *B. anomalus* e *B. intermedius* são frequentemente encontradas. A fase de maturação acontece após 10 meses, quando as bactérias produtoras de ácido láctico acabam diminuindo, além das leveduras *Brettanomyces*. Essa penúltima fase, de maturação, é procedida, por fim, pela refermentação, que acontece na garrafa. Na refermentação, leveduras *Brettanomyces* voltam a se desenvolver (VERACHTERT; ISERENTANT, 1995).

### 2.3 METABOLISMO DE CARBOIDRATOS

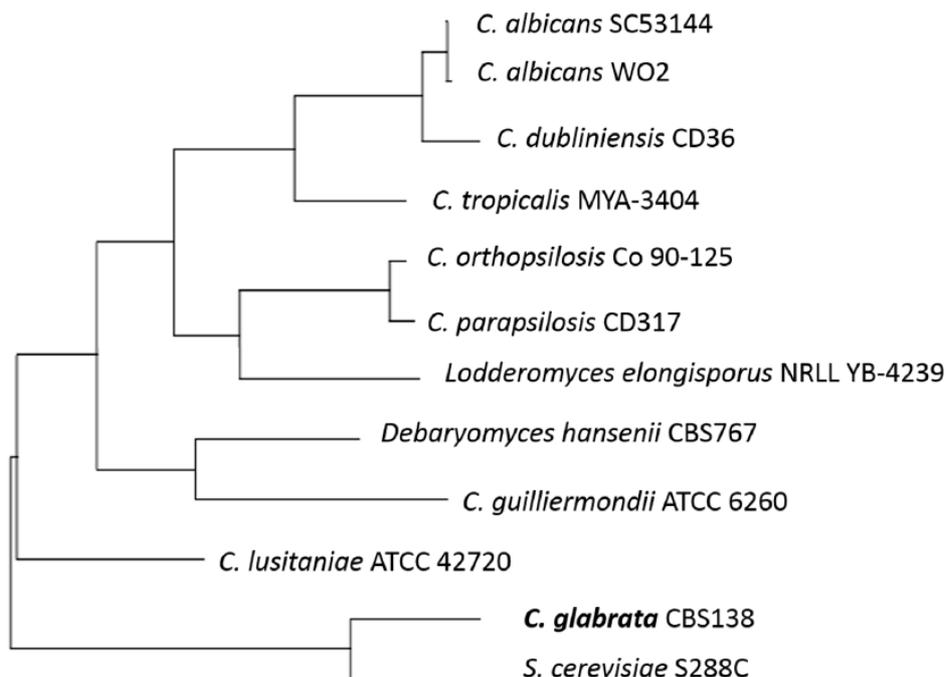
As leveduras encontradas no mosto podem metabolizar uma grande variedade de carboidratos. Algumas espécies, como *S. cerevisiae*, fermentam glicose, sacarose, frutose, maltose, galactose, rafinose, maltotriose e até mesmo

trealose. A glicose é o primeiro carboidrato a ser utilizado. Após o consumo completo da glicose, a maltose é então fermentada (sendo ela 50-60% do mosto). A maltotriose é o último carboidrato a ser utilizado (com 10-15% do mosto) e muitas vezes acaba não sendo metabolizada pelas leveduras (WILLAERT, 2001; ZHENG *et al.*, 1994; ALVES JR; THEVELEIN; STAMBUK, 2014). Polissacarídeos e dextrinas não são utilizadas pelas leveduras, o que contribui para o sabor e aroma da cerveja (BOULTON; QUAIN, 2001).

#### 2.4 LEVEDURAS *Candida glabrata*

A levedura *Candida glabrata* é um patógeno oportunista conhecida como um possível contaminante devido ao mosto estar exposto ao ambiente e a condições favoráveis ao seu surgimento, como recipientes não higienizados e principalmente pela presença de oxigênio (BOKULICH; BAMFORTH, 2013). Em razão disso, ela vem sendo isolada em fermentações espontâneas, principalmente de bebidas. Algumas análises mostram que a *C. glabrata* se assemelha mais a *Saccharomyces cerevisiae* do que a outra espécie do gênero, como a *C. albicans* (TAM *et al.*, 2015) demonstrada na figura 2.

Figura 1: Árvore filogenética de algumas espécies de leveduras relacionadas à *Candida glabrata*.



Fonte: (TAM *et al.*, 2015).

A *Candida glabrata* vem sendo encontrada em diferentes bebidas fermentadas, incluindo cervejas do tipo lambic (TIMKE, 2008). Ela já foi isolada na África, no chamado *Mawe*, que é uma bebida local tendo por base grãos de café e é produzida de forma espontânea (PEREIRA et al. 2014). Na China, foi isolada do tradicional licor chamado *Daqu*, nesse caso encontrada no início da fermentação (ZHENG et al., 2011). Na Índia, ela foi encontrada em massa de pães e mingau que utilizam como fonte de amido os grãos do chamado *Ragi* (milheto) (TAM et al., 2015).

## 2.5 LEVEDURAS *Brettanomyces*

As leveduras do gênero *Brettanomyces* foram isoladas pela primeira vez por Niels Claussen, colega de Emil Hansen na cervejaria Carlsberg. Essas leveduras eram responsáveis pelos aromas e sabores peculiares e pela segunda fermentação da cerveja (STEENSELS et al., 2015). Em 1960, o gênero *Dekkera* surgiu em homenagem a Nellie Margaretha Stelling-Dekker (pioneira sobre a sistemática desse gênero) e foi então introduzida na taxonomia como teleomórfico (sexual) de *Brettanomyces*. O nome *Brettanomyces* é ainda o mais utilizado quando se refere a trabalhos da indústria alimentícia (VAN DER WALT, 1964 apud CRAVWELS et al. 2015). Por essa razão o nome adotado durante este trabalho é *Brettanomyces*.

Espécies de *Brettanomyces* são consideradas um dos piores micróbios a serem encontrados na fermentação do vinho e é comum a sua eliminação durante o processo. Porém, no mundo cervejeiro, são muito bem vistas, devido às suas contribuições aromáticas, fermentações e por tolerar baixo pH (STEENSELS et al., 2015).

*Brettanomyces bruxellensis* tem um bom crescimento em temperaturas que variam entre 19 e 35°C, mas a temperatura ótima para essas leveduras é entre 25 e 28°C. Desse modo, a temperatura normalmente pouco influencia no crescimento e na produção de etanol por essa levedura. A *B. bruxellensis* é Crabtree positiva, prefere a fermentação ao invés da respiração na presença de oxigênio, fazendo com que ela venha a competir com outros microrganismos do mosto. As cepas são resistentes a altos teores de etanol presentes no mosto, o que a difere das *S. cerevisiae*, que acabam morrendo diante de altas concentrações de ácidos orgânicos. Alguns carboidratos também podem ser fermentados, mas em menor

velocidade em comparação com a utilização da glicose, como acontece com a maltose e frutose (CRAVWELS et al. 2015).

O barril em que se conduz o processo fermentativo também tem influência na composição de leveduras do mosto. Em um experimento realizado por MARTENS, ISERENTANT, VERACHTERT (1997), as cepas de *Brettanomyces*, presentes na fermentação da English Porter, desapareceram quando o líquido foi transferido dos barris de madeira para os recipientes metálicos. Isso comprova que os barris de madeira são essenciais para o desenvolvimento dessas leveduras. Da mesma forma, essa influência é também percebida na sucessão de espécies durante a fermentação espontânea de cervejas tipo lambic.

### 2.5.1 Compostos de aroma e sabor na cerveja Lambic

*Brettanomyces bruxellensis* pode ser responsável pela adição de aromas e sabores à cerveja. Além dos compostos voláteis presentes naturalmente no mosto, frutas e outras plantas adicionadas também contém voláteis que são bloqueados devido a ligações glicosídicas dos carboidratos. Esses sabores “bloqueados” podem ser liberados ao mosto pelas  $\beta$ -glicosidases que são encontradas nas células de *Brettanomyces* e não existem em *S. cerevisiae* (DAENE, 2008 *apud* CRAVWELS et al. 2015). Essas leveduras afetam, portanto, as características organolépticas da cerveja durante a fermentação. Muitos termos são usados para descrever o chamado “Brett flavors”, como por exemplo: floral, cítrico, celeiro, couro, cavalo, defumado entre outros (CRAVWELS et al. 2015).

## 2.6 ANÁLISE DE LEVEDURAS DAS CERVEJAS LAMBIC

A cerveja tipo Lambic é a cerveja mais antiga ainda produzida, como apresentado anteriormente, porém as pesquisas sobre os microrganismos que a caracterizam ainda são poucas. O mercado cervejeiro utiliza-se de leveduras com características de consumo total de carboidratos e produção de etanol rápidos, diferentemente de um processo de fermentação espontânea em que é necessário tempo e ambiente característicos. Possivelmente por essa razão, a pesquisa em torno desses microrganismos acaba sendo deixada em segundo plano, pois o interesse do mercado é outro. Entretanto, a produção de cerveja artesanal tem

crescido no país, e a compra e o uso de leveduras também. O pouco conhecimento da diversidade microbiológica se torna um empecilho aos produtores artesanais, pois acabam se tornando reféns apenas das cepas oferecidas no mercado. Dessa forma, através de pesquisas com leveduras de fermentação alcoólica espontânea, por exemplo, pode-se oferecer aos produtores novas opções de cepas. Assim, com a oferta de maior número de linhagens, o cervejeiro artesanal, além de ter uma maior diversidade de resultados (bioquímicos) no processo final, vai encontrar um leque maior de opções de leveduras para produzir sua cerveja conforme os seus objetivos de resultados.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.2 LEVEDURAS UTILIZADAS

As leveduras foram cedidas pela empresa LEVTECK. Entre as cepas analisadas, oito delas foram isoladas de uma fermentação espontânea tipo Lambic, realizada pela própria empresa LEVTECK, com adição de frutas maduras de acerola (*Malpighia glabra*). As linhagens 3C2, 3C8, 4C1 e 4C5 foram isoladas no início (30 dias) da fermentação e as cepas BC1, BC2, BC3 e BC4, após 120 dias de fermentação.

Além dessas leveduras, o presente trabalho também empregou uma linhagem industrial de *Brettanomyces bruxellensis* e a linhagem industrial do tipo lager W-34/70 (NAKAO et al. 2009).

Um repique fresco de cada uma das oito leveduras isoladas da produção Lambic da LEVTECK foi enviado para o Instituto Biológico de São Paulo (<http://www.biologico.sp.gov.br/>) para identificação taxonômica, por meio do sequenciamento da região ITS-5,8 (KURTZMAN, 2015).

#### 3.3 CONDIÇÕES DE CULTIVO E CRESCIMENTO CELULAR

Para o cultivo das leveduras foram utilizados meios ricos YP (10 g L<sup>-1</sup> de extrato de levedura e 20 g L<sup>-1</sup> de peptona bacteriológica) suplementados, alternadamente, com 20 g L<sup>-1</sup> do carboidrato de interesse (glicose, maltose ou maltotriose). Todos os meios foram esterilizados em autoclave por 15 min a 120°C e tiveram pH ajustado para 5,0 com a adição de ácido clorídrico. Para a verificação dos perfis de crescimento celular, as leveduras foram pré-cultivadas em tubos de ensaio com tampa contendo 3 mL de meio rico YP contendo 20 g L<sup>-1</sup> de glicose e incubadas por 48 horas a 25°C em agitador orbital sob agitação de 160 rpm. Em seguida, as leveduras do pré-cultivo foram inoculadas em frascos Erlenmeyer com 1/5 do volume e incubadas sob as mesmas condições descritas acima.

Para determinação do crescimento celular foram utilizadas as medidas da densidade óptica das amostras retiradas dos cultivos em tempos pré-estabelecidos em espectrofotômetro com feixe de 570 nm (DO570nm). Além disso, uma alíquota 500 µL de cada uma dessas amostras foi centrifugada (3 minutos a 3.500 g) e seu

sobrenadante armazenado em microtubo para posterior determinação do consumo de carboidratos e da produção de etanol e ácido acético.

Foram realizados dois experimentos independentes para cada cepa em cada uma das condições. Os resultados representam a média entre os ensaios. O desvio padrão foi sempre inferior a 10%.

### 3.4 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE CARBOIDRATOS, E ETANOL

As amostras de sobrenadantes coletadas durante os crescimentos celulares foram filtradas em filtro 0,45  $\mu\text{m}$  antes de serem transferidas para vials de cromatografia. As concentrações de glicose, maltose, maltotriose, etanol e ácido acético foram determinadas por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), com detector por índice de refração e coluna para ácidos orgânicos. A fase móvel utilizou 5,0 mM de ácido sulfúrico, a 50 °C, com fluxo de 0,6 mL  $\text{min}^{-1}$  durante 25 minutos por amostra. As curvas de calibração foram estabelecidas para todas as amostras analisadas, utilizando sete concentrações diferentes na faixa de 0,25 a 20,0 g  $\text{L}^{-1}$  para os carboidratos, 0,125 a 10,0 g  $\text{L}^{-1}$  para o etanol e 0,0625 a 5,0 g  $\text{L}^{-1}$  para o ácido acético.

### 3.5 RAPD-PCR

Para a realização da técnica de Amplificação Aleatória de DNA Polimórfico (RAPD-PCR), foi inicialmente extraído o DNA genômico de cada levedura, utilizando o kit comercial YeaStar Genomic DNA (Zymo Research), conforme recomendações do fabricante. O protocolo para RAPD-PCR foi adaptado de COSTA-SILVA, MELO-JÚNIOR, MORAES JUNIOR (2010). Foram utilizadas as seguintes condições: num volume total de 25  $\mu\text{l}$  de reação, primer (GTG)<sub>5</sub> (GTGGTGGTGGTGGTG) a 25 pmol, com 3 mM  $\text{MgCl}_2$ , 0,2 mM de cada DNTP, 1x Tampão *Taq* buffer, 50 ng de DNA genômico, 0,25 U de *Taq* polymerase e 0,25  $\mu\text{g}$  de BSA, com desnaturação inicial a 95 °C por 3 minutos, seguida de 35 ciclos com desnaturação a 94 °C por 30 segundos, anelamento a 50 °C por 1 minuto e polimerização a 72 °C por 1 minuto. A extensão final ocorreu a 72 °C por 10 minutos. Os resultados da PCR foram visualizados por eletroforese em gel de agarose 1,5% a 70 V por 1 hora e 30 minutos.

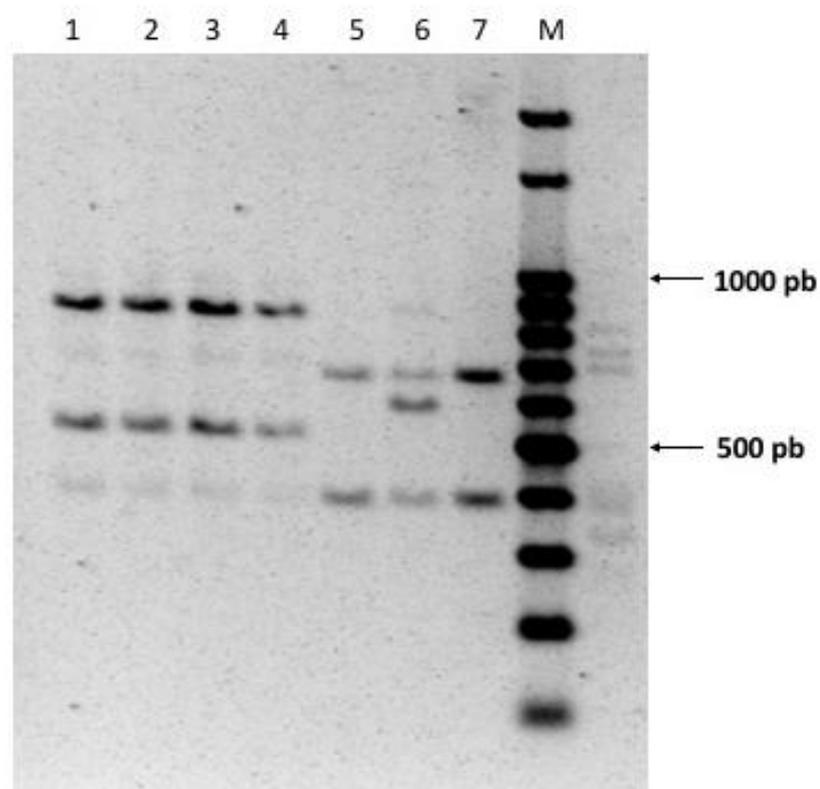
## 4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

### 4.1 IDENTIFICAÇÃO TAXÔNOMICA

No intuito de agrupar linhagens filogeneticamente aparentadas e distinguir aquelas menos relacionadas, foi realizada uma RAPD-PCR com o primer (GTG)<sub>5</sub>. No trabalho de COSTA-SILVA, MELO-JÚNIOR, MORAES JUNIOR (2010), a realização de RAPD com o referido primer é apontada como viável análise preliminar à identificação taxonômica. Contudo, como pode ser observado na Figura 2, a metodologia empregada foi insuficiente para gerar um perfil de bandas (*fingerprinting* de DNA) distinto entre as linhagens isoladas no início (3C2 e 4C1) e no fim (BC3 e BC4) do processo fermentativo da produção de cerveja Lambic de onde foram obtidas as cepas. Desse modo, verifica-se que a presente metodologia é insatisfatória para distinguir leveduras que possam estar presentes no mosto cervejeiro durante a produção de cerveja do tipo Lambic. Por outro lado, as duas linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* analisadas na RAPD-PCR apresentaram *fingerprinting* idêntico entre si (conforme esperado) e diferente das demais. Além disso, um perfil de bandas distinto também foi observado para a cepa lager W-34/70 (Figura 2).

Apesar do insucesso da metodologia de RAPD-PCR para a distinção das leveduras isoladas da fermentação espontânea, as linhagens puderam ser identificadas taxonomicamente no Instituto Biológico de São Paulo, por meio do sequenciamento de regiões conservadas do genoma de leveduras (conforme apresentado na seção 3.1): as linhagens 3C2, 3C8, 4C1 e 4C5 pertencem à espécie *Candida glabrata* e as cepas BC1, BC2, BC3 e BC4, à espécie *Brettanomyces bruxellensis*.

Figura 2: Resultado obtido com análise de RAPD-PCR com o primer (GTG)5. (1) BC3, (2) BC4 (isoladas no fim da fermentação), (3) 3C2, (4) 4C1 (isoladas no início da fermentação), (5) *S. cerevisiae* de cervejaria, (6) W-34/70, (7) PE-2 (cepa de *S. cerevisiae* utilizada na produção de etanol combustível), (M) marcador de tamanho molecular.



Fonte: Elaborado pela autora (2017).

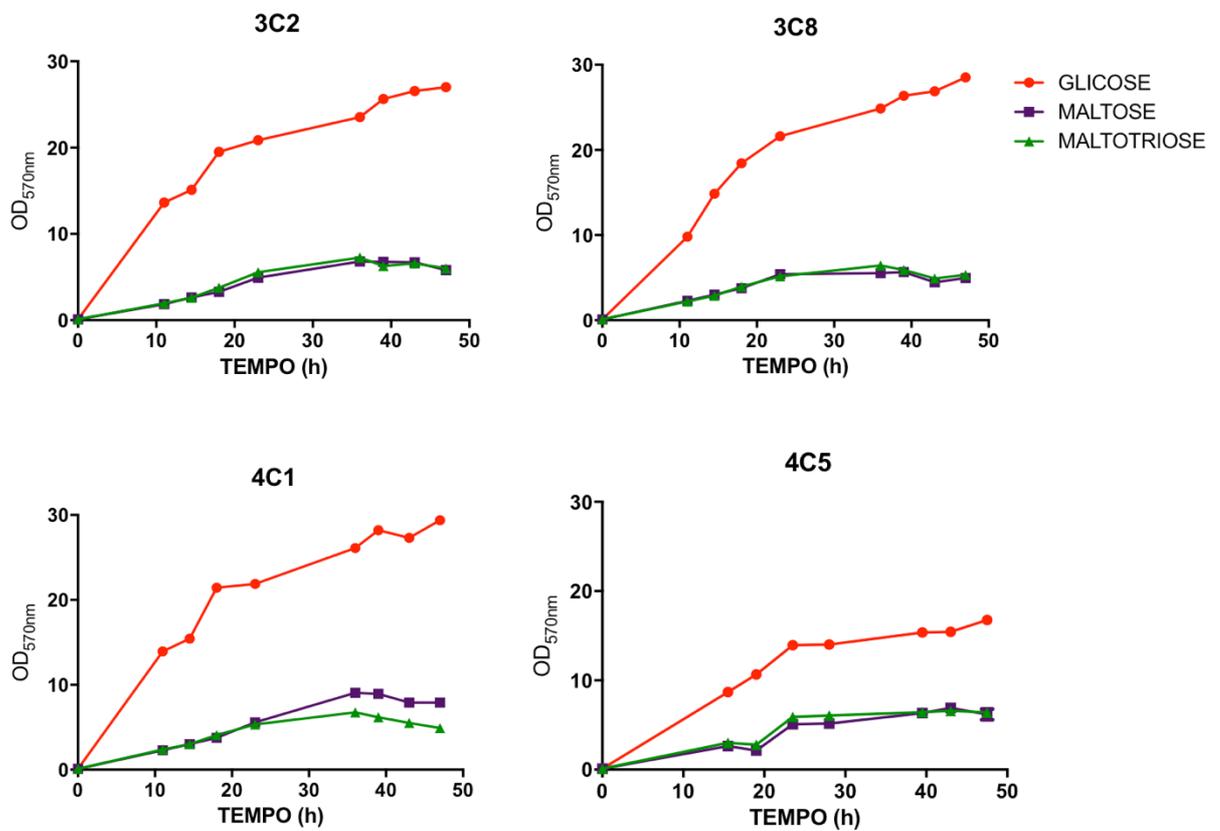
## 4.2 CRESCIMENTO, CONSUMO DE CARBOIDRATOS E PRODUÇÃO DE ETANOL

### 4.2.1 Fermentação alcoólica de *Candida glabrata*

Após identificação taxonômica, todas as cepas foram testadas frente a 3 diferentes carboidratos: glicose, maltose e maltotriose. Observa-se que todas as cepas de *C. glabrata* cresceram rapidamente em glicose (Figura 3) tendo três delas (3C2, 3C8 e 4C1) consumido por completo esse monossacarídeo já nas primeiras 15 horas de experimento – apenas a cepa 4C5 precisou de 24 h para exaurir a glicose do meio (vide Figura 4). Entretanto, quando testadas em maltose e maltotriose, as cepas foram incapazes de utilizar os carboidratos como fontes de carbono. Os valores de DO apresentados durante os cultivos celulares no dissacarídeo e trissacarídeo em questão referem-se, portanto, muito provavelmente à utilização dos componentes do extrato de levedura e peptona (componentes do meio – vide Material e Métodos) como fontes de carbono e nitrogênio (vide Figuras 3 e 4). Esses dados corroboram os resultados obtidos por BOULTON; QUAIN (2001), FREYDIERE et al. (2003) e DEVADAS et al. (2017), que demonstraram que a espécie *C. glabrata* apresenta uma maquinaria celular incapaz de metabolizar maltose e maltotriose.

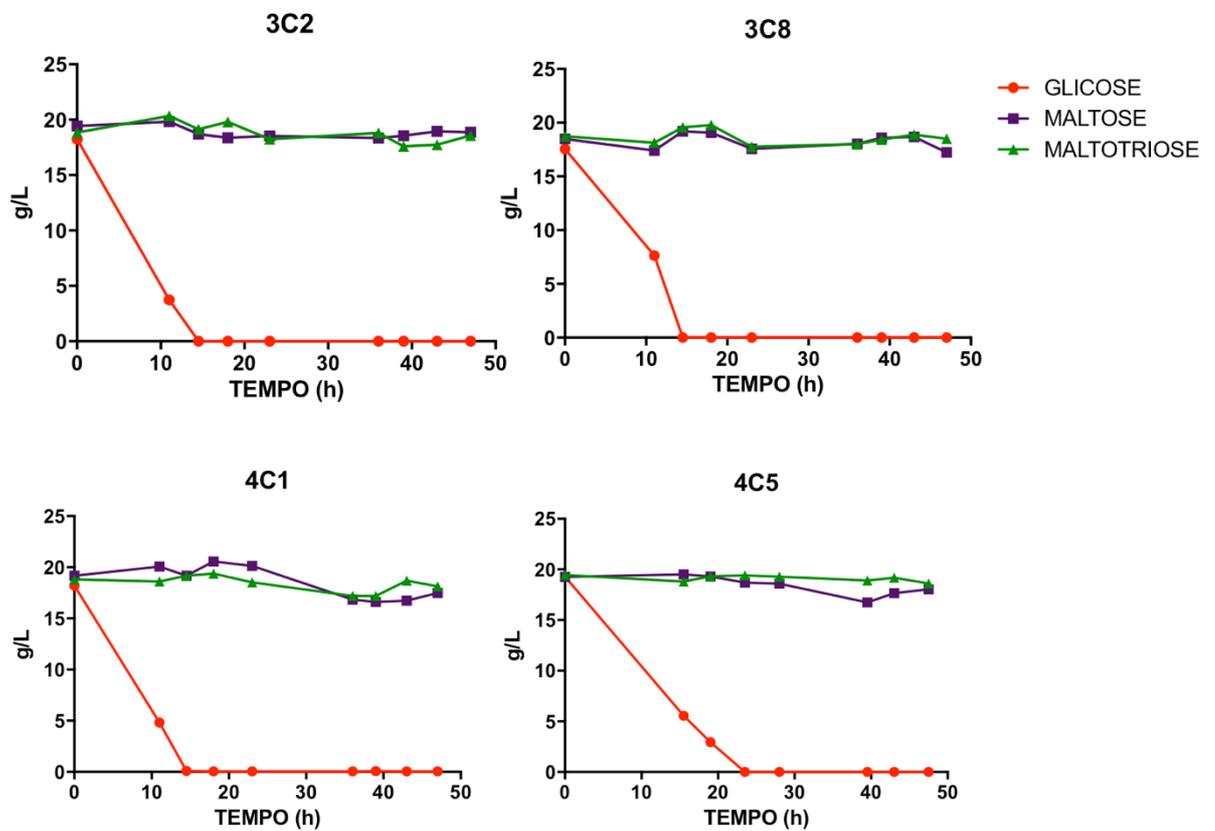
Além do crescimento celular e do consumo de carboidratos, a produção de etanol também foi avaliada. Observa-se na figura 5 que as cepas 3C2, 3C8, 4C1 e 4C5 produziram etanol a partir glicose. No entanto, como já se esperava, haja vista a ausência de consumo de maltose e maltotriose, essas quatro cepas foram incapazes de fermentar esses  $\alpha$ -glicosídeos. A produção de etanol também apresentou picos altos nas primeiras horas de fermentação, logo que o carboidrato do meio terminou de ser consumido. Com o passar das horas, no entanto, diante da depleção da glicose, o próprio etanol foi consumido pelas células, tendo sua concentração no meio diminuído, chegando a quase zero após 45 horas de incubação. Levando-se em conta, portanto, a produção de etanol em meio contendo glicose como fonte de carbono, os dados indicam que as cepas de *C. glabrata* são eficientes fermentadoras de glicose, uma vez que chegaram a apresentar aproximadamente 88% do rendimento máximo teórico de etanol (HAMELINCK et al. 2005).

Figura 3: Crescimento em glicose, maltose e maltotriose das cepas 3C2, 3C3, 4C1 e 4C5 (*C. glabrata*).



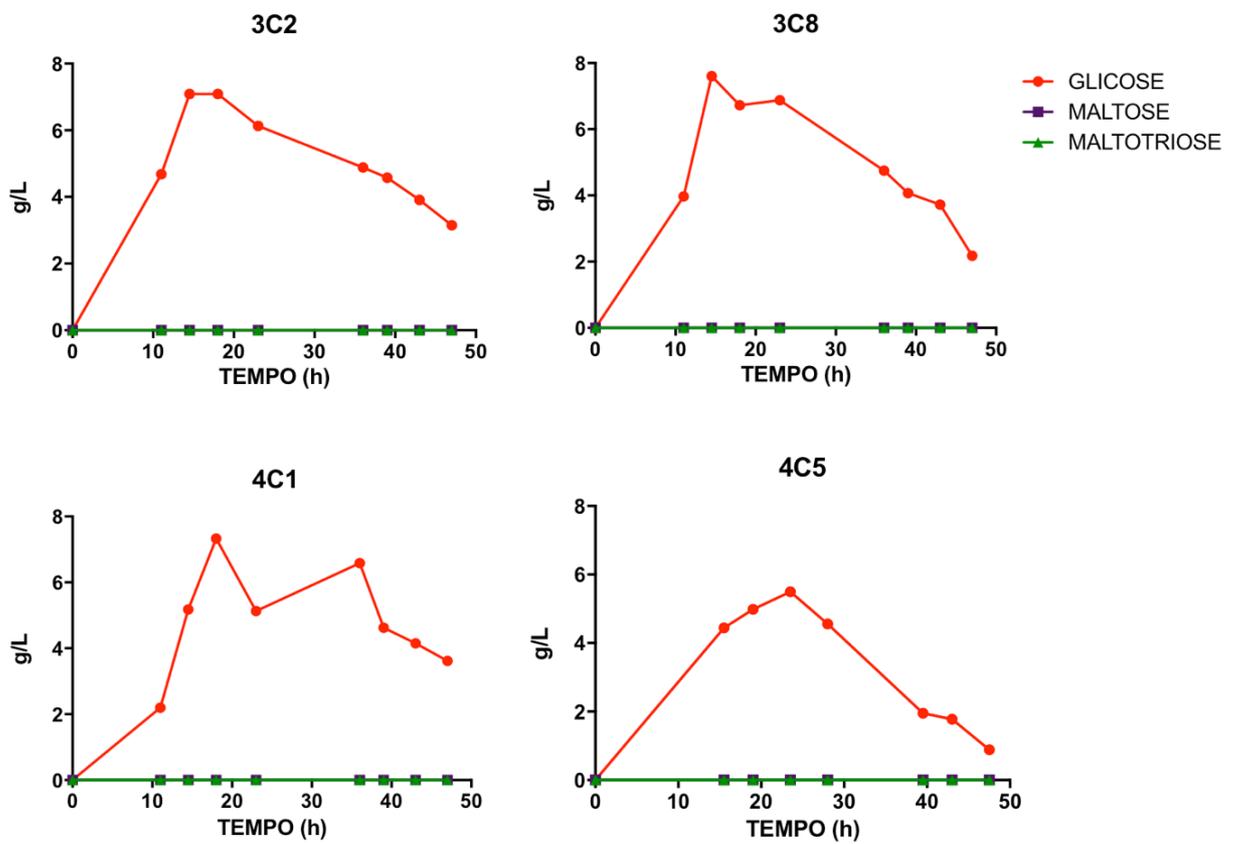
Fonte: Elaborada pela autora (2017).

Figura 4: Consumo de glicose, maltose e maltotriose pelas cepas 3C3, 3C8, 4C1 e 4C5.



Fonte: Elaborada pela autora (2017).

Figura 5: Produção de etanol das cepas 3C2, 3C8, 4C1 e 4C5 em glicose, maltose e maltotriose.



Fonte: Elaborada pela autora (2017).

#### 4.2.2 Fermentação alcoólica de *Brettanomyces bruxellensis*

Os crescimentos celulares das cepas de *Brettanomyces bruxellensis* apresentaram resultados bastante distintos entre si. Observa-se nas figuras 6 e 9-A que o crescimento em glicose das cepas BC1, BC2 e da *B. bruxellensis* industrial iniciou apenas após 20 h da inoculação das leveduras. Esse crescimento lento de *B. bruxellensis* é normal quando essas leveduras são isoladas de fermentações espontâneas, como mostrado por GILLILAND; FRIC (1961) e CRAVWELS et al. (2015). No primeiro experimento realizado por GILLILAND; FRIC (1961), foram incubadas leveduras de mosto cervejeiro por 24 dias a 25°C. Em glicose, as cepas de *Brettanomyces* demoraram até 4 dias para iniciar sua fermentação, já em maltose não ocorreu fermentação nos primeiros 15 dias de experimento. CRAVWELS et al. (2015) menciona que *B. bruxellensis* tem melhor afinidade com glicose e que, apesar da fermentação ser lenta, ela apresenta uma melhor degradação de carboidratos complexos e dextrinas que *S. cerevisiae*, como maltotetraose e maltopentaose. Como resultado do crescimento lento, as cepas BC2 e *B. bruxellensis* industrial não indicaram consumo de maltose e maltotriose (Figura 7 e 9-B), diferentemente da cepa BC1 (figura 7), que quando superou a fase *lag* consumiu a glicose por completo e utilizou a maior parte da maltose e da maltotriose mesmo tendo um consumo retardado. Os resultados obtidos com as cepas BC1, BC2 e *B. bruxellensis* industrial mostram que 48 horas de experimento é insuficiente para uma real análise de crescimento das leveduras e posterior consumo de carboidratos.

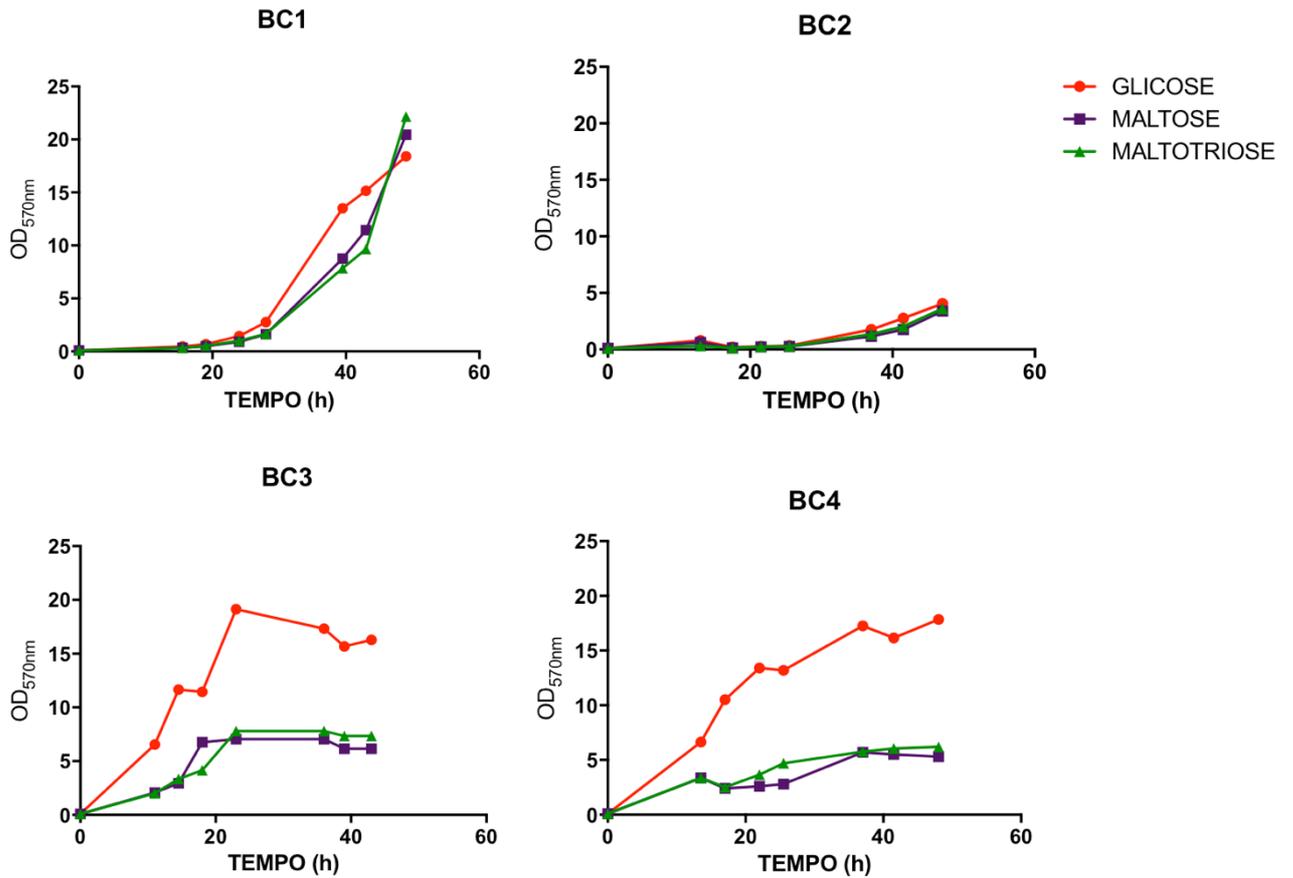
Ao observar os dados obtidos com as cepas BC3 e BC4, nota-se que o início do crescimento em glicose ocorre antes de 20 horas após a inoculação das leveduras (Figura 6), e o consumo desse monossacarídeo é concluído em menos de 40 h de cultivo (Figura 7). Entretanto, elas não foram capazes de consumir maltose e maltotriose (Figura 7). Em um experimento realizado por BLOMQUIST et al. (2010), os autores mostraram que, nas primeiras 50 horas de crescimento em glicose, as cepas de *B. bruxellensis* apresentaram algum consumo desse carboidrato, diferentemente de quando testadas em maltose, quando levaram mais de 100 horas para consumir o dissacarídeo. Além da literatura encontrada, que coloca as cepas de *B. bruxellensis* como leveduras tardias em crescimento e consumo de maltose, pôde-se observar durante esta pesquisa que elas podem apresentar comportamento

parecido quando testadas em maltotriose. Não foi encontrado, até o término dessa pesquisa, bibliografia referente a crescimento e consumo de maltotriose por *B. bruxellensis*. Esses resultados podem sugerir que cepas selvagens de *B. bruxellensis* necessitem de estudos futuros sobre o seu possível desempenho nesse trissacarídeo.

Estima-se que a temperatura utilizada para crescimento no presente trabalho não influenciou nos resultados, pois sabe-se que a temperatura ótima para *B. bruxellensis* é de 25°C e que a partir de 37°C as cepas passam a produzir menos biomassa (BLOMQUIST et al, 2010).

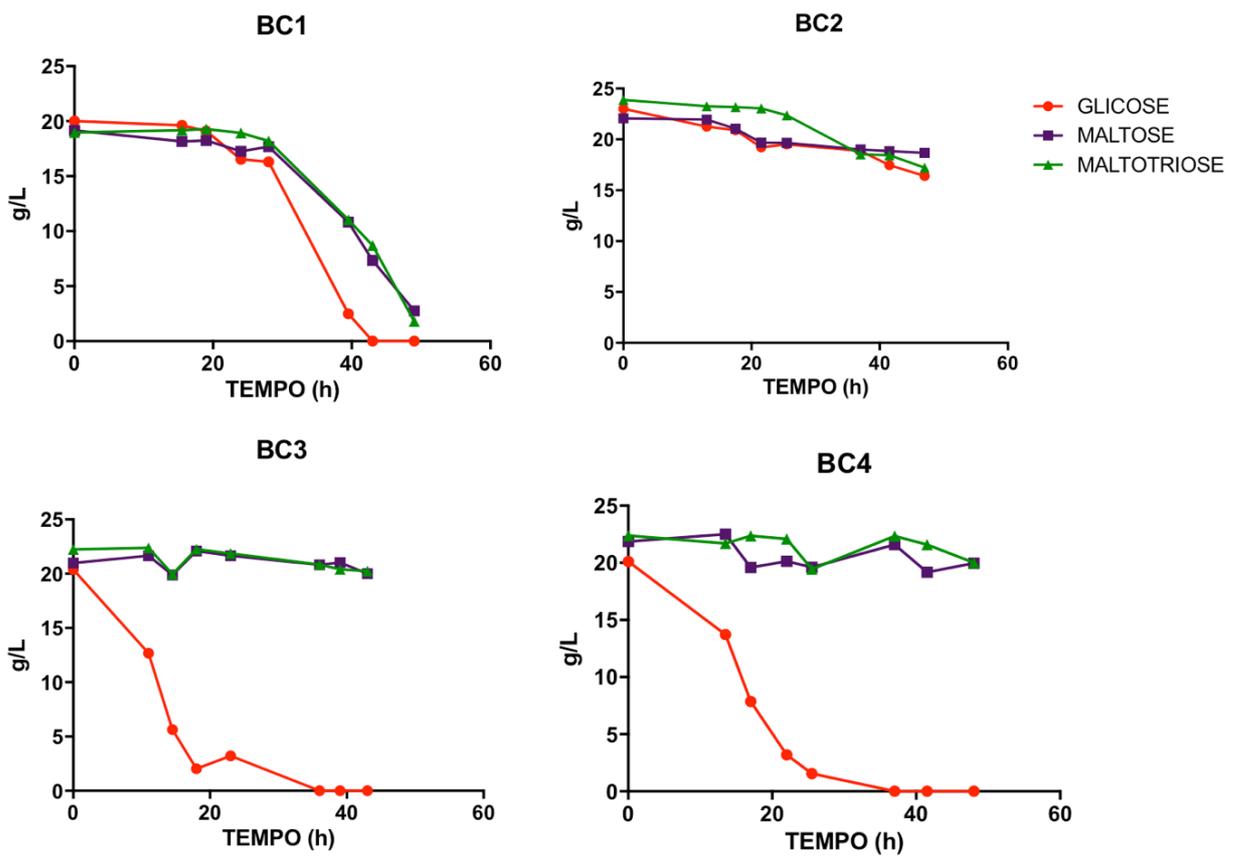
As cepas foram também avaliadas quanto à produção de etanol. Visualiza-se que, quando testadas em glicose, as cepas BC1, BC3 e BC4 (Figura 8) foram capazes de produzir etanol, entretanto em maltose e maltotriose as cepas BC3 e BC4 não produziram etanol. A levedura BC1 foi a única das cepas *Brettanomyces* a produzir etanol nos 3 carboidratos utilizados, como pode ser observado na figura 8. Por outro lado, a cepa BC2 não produziu etanol a partir de nenhum dos carboidratos analisados (Figura 8). A *B. bruxellensis* industrial começou a produção de etanol em glicose, maltose e maltotriose apenas nas últimas horas de experimento (Figura 9-C), por essa razão seria necessário maior tempo de crescimento para melhores análises de fermentação com essa cepa. Apesar das cepas BC1, BC3 e BC4 consumirem toda a glicose, não produziram níveis altos de etanol em comparação com o que foi observado, neste trabalho, para as linhagens de *C. glabrata*. Uma possível consequência disso é a produção de ácido acético, pois as *Brettanomyces* são conhecidas por produzirem quantidades expressivas de acetato além de etanol (AGNOLUCCI et al. 2017). Esse gênero de levedura apresenta em suas células atividade esterase, isso quer dizer que as células de *B. bruxellensis* catalisam reações de hidrólises de ligações éster – ela sintetiza etil acetato e etil lactato advindos do etanol fazendo com que os níveis de ácidos aumentem até que o equilíbrio no mosto seja alcançado (SPAEPEN, VERACHTERT, 1981). De fato, como apresentado a seguir, na seção 4.2.4, ao menos para a cepa BC1, essa pode ser uma provável explicação para o baixo rendimento de etanol observado no presente trabalho.

Figura 6: Crescimento de BC1, BC2, BC3 e BC4 (*B. bruxellensis*) em glicose, maltose e maltotriose.



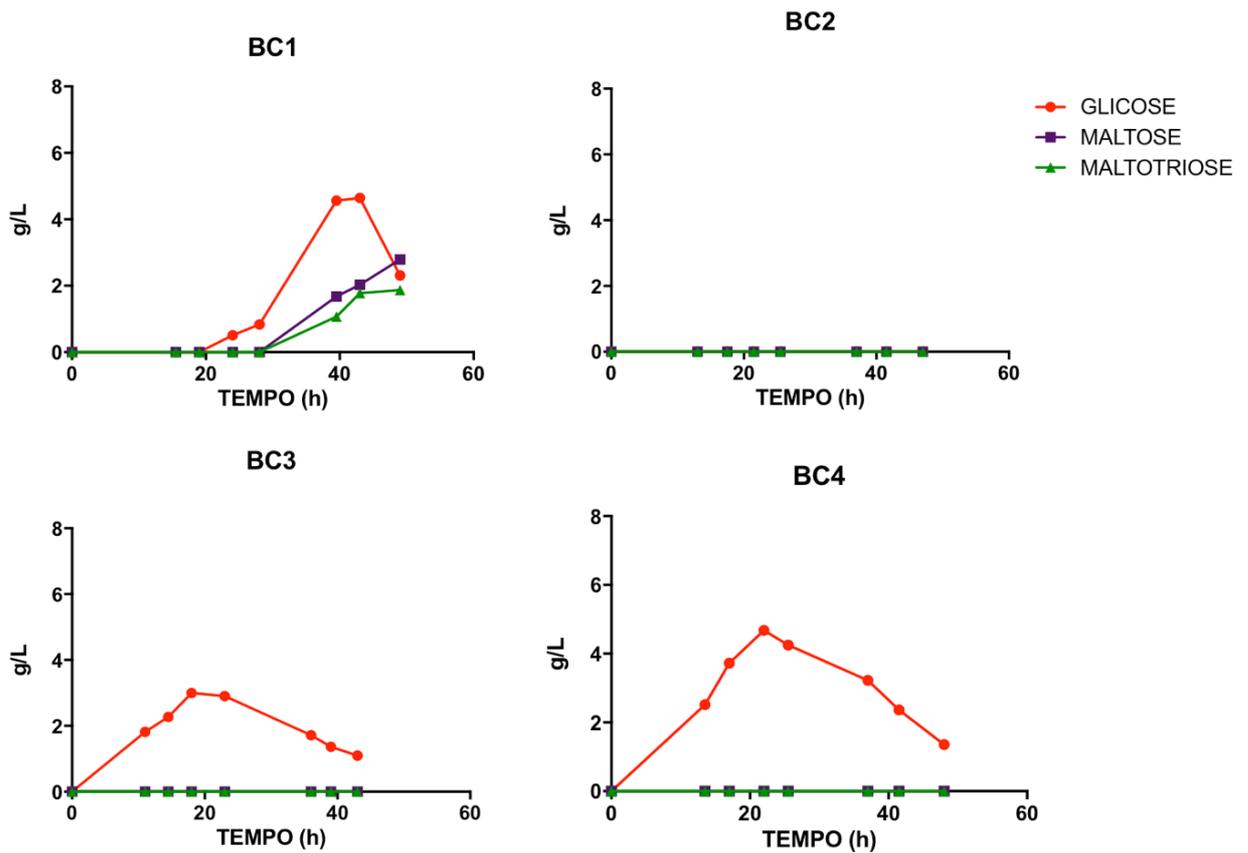
Fonte: Elaborada pela autora (2017).

Figura 7: Consumo de glicose, maltose e maltotriose pelas cepas BC1, BC2, BC3 e BC4.



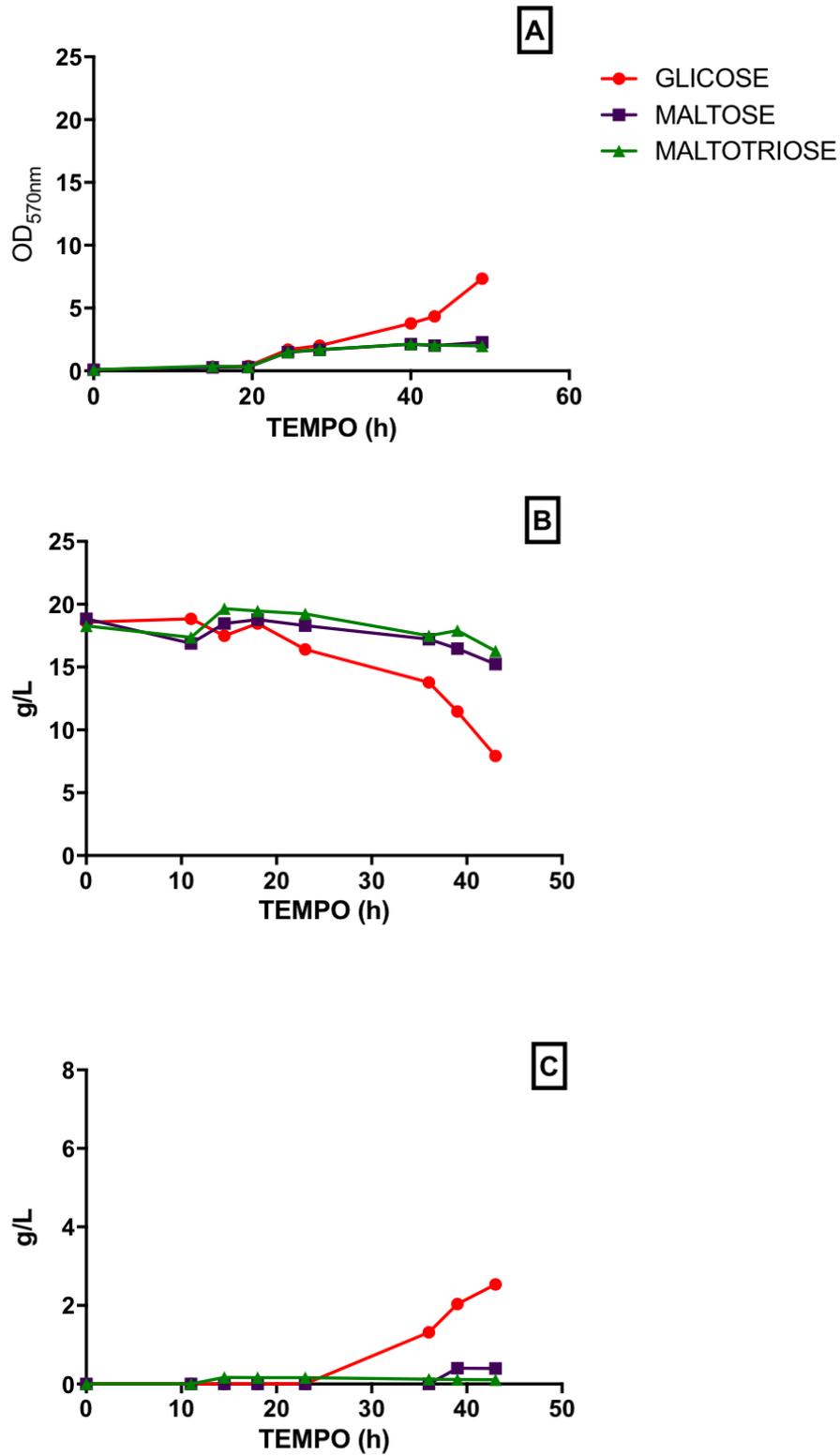
Fonte: Elaborada pela autora (2017).

Figura 8: Produção de etanol por BC1, BC2, BC3 e BC4 em glicose, maltose e maltotriose.



Fonte: Elaborada pela autora (2017).

Figura 9: Crescimento (A), consumo de carboidratos (B) e produção de etanol (C) pela cepa industrial de *B. bruxellensis*.

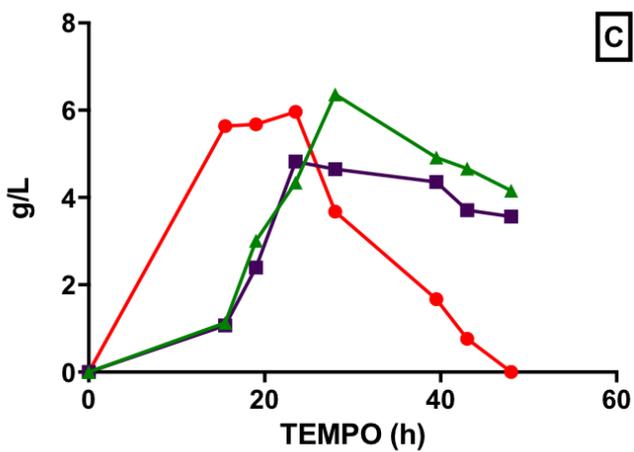
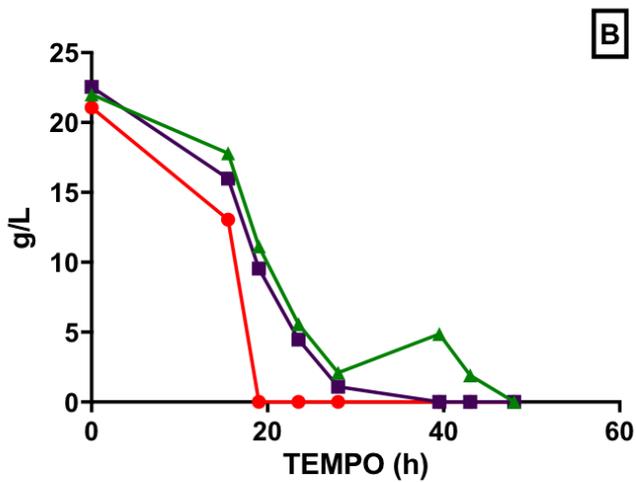
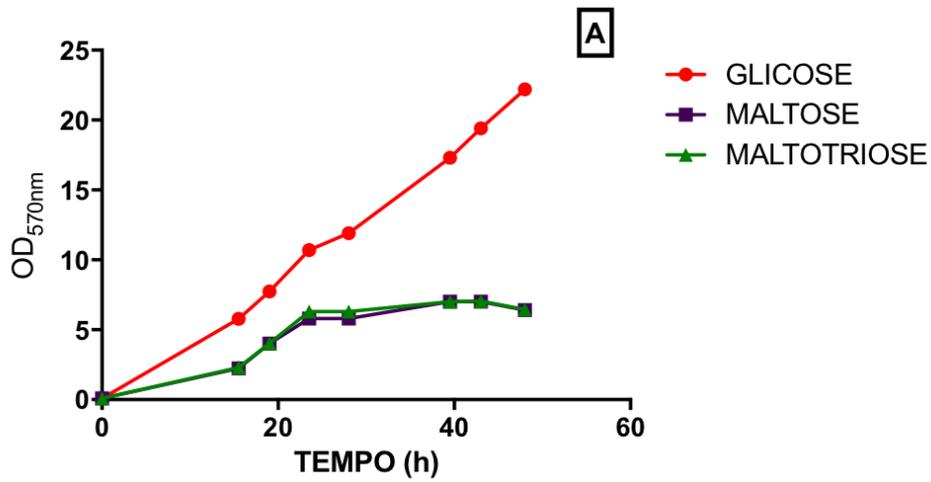


Fonte: Elaborada pela autora (2017).

#### 4.2.3 Fermentação alcoólica de *Saccharomyces pastorianus* (W-34/70)

Observando os dados da cepa W-34/70, nota-se que os crescimentos em glicose, maltose e maltotriose apresentaram picos diferentes (Figura 10-A). Pode-se sugerir que a temperatura utilizada de 25°C ao longo desta pesquisa possivelmente influenciou nos 3 cenários. A levedura W-34/70 é muito utilizada para a produção de cervejas lager, ou seja, necessita de temperaturas baixas para crescimento ótimo (BLEOANCA, 2013). O que foi constatado nesse trabalho, entretanto, foi um rendimento de etanol em glicose inferior ao observado com as cepas *C. glabrata* (espécie não empregada tradicionalmente na indústria fermentativa), embora as células da W-34/70 tenham sido capazes de fermentar também a maltose e a maltotriose (o que não ocorreu com *C. glabrata*) (vide Figura 10-B e 10-C). Cabe ainda salientar que a temperatura dentro da dorna de uma fermentação lager pode chegar a ínfimos 2°C para que as cepas possam atingir seu melhor pico de fermentação (BLEOANCA, 2013). Portanto, é provável que a temperatura empregada neste trabalho tenha afetado negativamente o desempenho da W-34/70. Desse modo, seriam interessantes outros estudos sobre essa cepa, nos mesmo meios aqui analisados, porém sob diferentes temperaturas.

Figura 10: Crescimento (A), consumo de carboidratos (B) e produção de etanol (C) da cepa W34/70.



Fonte: Elaborada pela autora (2017).

#### 4.2.4 Produção de ácido acético

Após as amostras serem analisadas quanto à produção de etanol, foi verificada também a produção de ácido acético pelas leveduras. Analisando a Tabela 1, observa-se que as cepas de *Candida glabrata* (3C8 e 4C1) produziram ácido acético quando cultivadas em glicose. Essa produção, apesar de ser baixa, demonstra que leveduras presentes no início de uma fermentação Lambic podem acidificar o mosto já no início do processo. Segundo VERACHTERT; DEBOURG (1995), o primeiro mês de fermentação de uma cerveja Lambic é caracterizada pela presença de bactérias produtoras de ácido acético e que leveduras também são facilmente encontradas. Além disso, esses mesmos autores isolaram também cepas do gênero *Candida*. VERACHTERT; DEBOURG (1995) também colocam que microrganismos encontrados nos primeiros meses de fermentação são incapazes de fermentar maltose, o que corrobora o isolamento das cepas de *C. glabrata* no início do processo fermentativo. Os dados de produção de etanol (figura 5) e ácido acético (Tabela 1) reforçam a incapacidade de *Candida glabrata* fermentarem maltose e também maltotriose.

Três cepas de *B. Bruxellensis* produziram ácido acético durante os crescimentos celulares (Tabela 1). A cepa BC1 produziu ácido acético nos 3 carboidratos, diferentemente das outras leveduras *Brettanomyces*. Os níveis encontrados se mostraram interessantes em comparação com o experimento realizado por BENIGNO et al. (2013), que obteve  $4 \text{ g L}^{-1}$  de ácido acético em glicose após 100 horas de fermentação. No presente trabalho, a cepa BC1 atingiu  $4,78 \text{ g L}^{-1}$  durante as 48 horas de incubação em meio com essa hexose. Os níveis de ácido acético em maltose e maltotriose produzido pela cepa BC1 foram altos em comparação com as cepas BC2 e BC3 (Tabela 1), que também produziram ácido acético, porém em valores menores. Como a cepa BC1 produziu níveis elevados de ácido acético em maltose e maltotriose, conforme pode ser visto na Tabela 1, esse comportamento pode explicar a baixa produção de etanol durante o crescimento nos dois carboidratos (Figura 8). As cepas 3C2, 4C5, BC4, *B. bruxellensis* industrial e a cepa W-34/70 não produziram ácido acético.

Apesar dos níveis de ácido acético terem sido baixos para a maior parte das cepas testadas, o ácido acético é um dos principais “Brett flavors” e influenciam no pH de uma fermentação Lambic (VERACHTERT; DEBOURG, 1995). Com isso, a

partir dos níveis de ácido acético analisados nesta pesquisa, há um indicativo de que as leveduras analisadas possam influenciar o sabor e o aroma da cerveja deixando a bebida azeda, caso venham a ser empregadas em processos produtivos (<http://www.flavornet.org/flavornet.html>).

Tabela 1: Produção de ácido acético a partir de diferentes carboidratos por todas as leveduras testadas.

PRODUÇÃO DE ÁCIDO ACÉTICO A PARTIR DE DIFERENTES CARBIODRATOS (g L <sup>-1</sup> )			
LINHAGEM	GLICOSE	MALTOSE	MALTOTRIOSE
<i>Candida glabrata</i>			
3C2	0,00	0,00	0,00
3C8	<b>0,39</b>	0,00	0,00
4C1	<b>0,43</b>	0,00	0,00
4C5	0,00	0,00	0,00
<i>B. bruxellensis</i>			
BC1	<b>4,78</b>	<b>4,18</b>	<b>4,51</b>
BC2	0,00	<b>0,8</b>	<b>0,9</b>
BC3	<b>0,58</b>	0,00	0,00
BC4	0,00	0,00	0,00
Industrial	0,00	0,00	0,00
<i>S. pastorianus</i>			
W34/70	0,00	0,00	0,00

## 5 CONCLUSÕES

A realização de RAPD-PCR sem a identificação pelo Instituto Biológico de São Paulo não seria suficiente para a distinção taxonômica das leveduras. A metodologia RAPD empregada, portanto, é insuficiente para diferenciar leveduras encontradas na produção de cerveja do tipo Lambic.

As cepas de *Candida glabrata* apresentaram crescimento rápido em glicose, porém foram incapazes de mostrar crescimento em maltose e maltotriose. As cepas de *Brettanomyces bruxellensis* apresentaram crescimento mais lento em comparação às cepas de *C. glabrata* em glicose e, com exceção da cepa BC1, que foi capaz de crescer utilizando os três carboidratos, também tiveram dificuldade de consumir a maltose e a maltotriose.

As cepas de *Candida glabrata* e a maior parte das cepas de *Brettanomyces Bruxellensis* se mostraram incapazes de fermentar toda a maltose e a maltotriose. As leveduras *C. glabrata*, por outro lado, fermentaram eficientemente a glicose, produzindo maior quantidade de etanol comparado com as cepas industriais utilizadas neste trabalho. As cepas BC1, BC3 e BC4 de *B. bruxellensis* foram capazes de fermentar a glicose, e as cepas BC1 e BC3 também produziram ácido acético a partir dessa hexose. A cepa BC2, da mesma espécie, apesar de consumir níveis desprezíveis de glicose, maltose e maltotriose e não produzir etanol, foi capaz de produzir ácido acético.

Considerando ser a fermentação de maltose e maltotriose altamente desejável ao mercado cervejeiro, uma vez que representam 60% do mosto, dificilmente as leveduras isoladas da cerveja Lambic produzida pela LEVTECK, seriam capazes de produzir, sozinhas, uma cerveja com as características organolépticas adequadas, com exceção da cepa BC1 de *B. bruxellensis*, que consumiu e fermentou as três fontes de carbono testadas.

Este trabalho, portanto, serve como base para que novas pesquisas sejam realizadas no futuro. Seriam interessantes estudos que adentrem a capacidade das cepas de *C. glabrata* e *B. Bruxellensis* em fermentar e produzir compostos orgânicos que influenciem nas características finais da cerveja, principalmente a partir da fermentação da maltose e da maltotriose, em diferentes condições de cultivo (aumentando a concentração celular e de carboidrato no meio, por exemplo). Além disso, é importante aprofundar pesquisas sobre a produção de cerveja Lambic no

Brasil, levando em consideração que sua produção é preferencialmente localizada na Bélgica, sob o argumento das influências ambientais sobre a qualidade do produto final.

## REFERÊNCIAS

AGNOLUCCI, M. et al. *Brettanomyces bruxellensis* yeasts: impact on wine and winemaking. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 33, n. 10, 2017.

ALVES JR, S. L.; THEVELEIN, J. M.; STAMBUK, B. U. EXPRESSION OF *Saccharomyces cerevisiae*  $\alpha$ -GLUCOSIDE TRANSPORTERS UNDER DIFFERENT GROWTH CONDITIONS. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 31, n. 1, p. 1–8, 2014.

BENIGNO, O. et al. Effect of Glucose Concentrations on the Growth and Metabolism of *Brettanomyces bruxellensis* under Aerobic Conditions. **Advances in Microbiology**, v. 3, p. 227-232, 2013.

BLEOANCA, I. et al. Relationship between ethanol and oxidative stress in laboratory and brewing yeast strains. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 116, n. 6, p. 697-705, 2013.

BLOMQVIST, J. et al. Fermentation characteristics of *Dekkera bruxellensis*. **Applied Microbial and Cell Physiology**, v. 87, p. 1487-1497, 2010.

BOULTON, Chris; QUAIN, David. **Brewing yeast and fermentation**. 1 ed. Inglaterra: Blackwell Science, 2001. 659 p.

BRAIDWOOD, R. J. et al. **Did Man Once Live by Beer Alone? Reviewed work American Anthropologist , New Series**. [s.l: s.n.].

BOKULICHA, Nicholas A.; BAMFORTH, Charles W. The Microbiology of Malting and Brewing. **American Society for Microbiology**, v. 77, p. 157-172, 2013.

CRAUWELS, S. et al. *Brettanomyces Bruxellensis*, Essential Contributor in Spontaneous Beer Fermentations Providing Novel Opportunities for the Brewing Industry. **BrewingScience**, v. 68, p. 110-122, 2015.

DE BARROS LOPES, M. et al. Differentiation and species identification of yeasts using PCR. **International journal of systematic bacteriology**, v. 48 Pt 1, n. 1 998, p. 279–286, 1998.

DEVADAS, S. M. et al. Auxanographic Carbohydrate Assimilation Method for Large Scale Yeast Identification. **Journal of Clinical and Diagnostic Research**, v. 11, n. 4, p. 1-3, 2017.

EUROMONITOR INTERNATIONAL. **Beer in Brazil**. Disponível em: <<http://www.euromonitor.com/beer-in-brazil/report>>. Acesso em: 24 nov. 2017.

FREYDIERE, A. et al. Rapid Identification of *Candida glabrata* with a New Commercial Test, GLABRATA RTT. **Journal of clinical microbiology**, [S.L], v. 48, n. 8, p. 3861-3863, 2003.

GILLILAND, R. B. Brettanomyces I Occurrence, Characteristics, and Effects on Beer Flavour. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 67, n. 3, p. 257–261, 1961.

GILLILAND, R. B.; FRIC, B.A. Brettanomyces II Taxonomic significance of slow fermentations and a description of a new species. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 68, np. 1962.

GRETTON, John F. The history of beer. **Journal of The Institute of Brewing**, [S.L], p. 356-368, 1929. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/j.2050-0416.1929.tb05204.x/epdf>>. Acesso em: 17 ago. 2017.

HAMELINCK, CN.; VAN HOOIJDONK, G. & FAAIJ. Ethanol from lignocellulosic biomass: techno-economic performance in short-, middle- and long-term. **Biomass and Bioenergy**. v. 28, np. 384-410, 2005

HORNSEY, Ian S. A history of beer and brewing. 1 ed. Cornwall, Inglaterra: **RSC**, 2003.

JACKSON, Michael. *The World's Great Beer Styles, Gastronomy, and Traditions*. 2. Ed. Londres: Duncan Baird Publishers, 1997. 288 p.

KIRIN HOLDINGS COMPANY. **Per capita beer consumption by country in 2014**. Disponível em: <[http://www.kirinholdings.co.jp/english/news/2015/1224\\_01.html#table3](http://www.kirinholdings.co.jp/english/news/2015/1224_01.html#table3)>. Acesso em: 23 nov. 2017.

KURTZMAN, Cletus P. Identification of food and beverage spoilage yeasts from DNA sequence analyses. **International Journal of Food Microbiology**, v. 213, p. 71-78, 2015.

MARTENS, H.; ISERENTANT, D.; VERACHTERT, H. Microbiological Aspects of a Mixed Yeast—Bacterial Fermentation in the Production of a Special Belgian Acidic Ale. **Journal of the Institute of Brewing and Distilling**, v. 103, p. 85–91, 1997.

MEUSSDOERFFER, F. G. A Comprehensive History of Beer Brewing. In: **Handbook of Brewing: Processes, Technology, Markets**. [s.l: s.n.]. p. 1–42.

MICHEIAND, Rudolph H.; MCGOVERN, Patrick E.; BADIÉ, Virginia R. Chemical detection of ancient fermented beverages. **American Chemical Society**, v. 68, n. 8, p. 408-413, 1993.

NAKAO, Y. et al. Genome sequence of the lager brewing yeast, an interspecies hybrid. **DNA Research**, v. 16, n. 2, p. 115–129, 2009.

PEREIRA, G. V. D. M. et al. Isolation, selection and evaluation of yeasts for use in fermentation of coffee beans by the wet process. **International Journal of Food Microbiology**, v. 188, p. 60-66, 2011.

RABIE, C. J. et al. Enumeration of fungi in barley. **International Journal of Food Microbiology**, [S.L], v. 35, n. 2, p. 117-127, 1997.

STEENSELS, J. et al. Brettanomyces yeasts — From spoilage organisms to valuable contributors to industrial fermentations. **International Journal of Food Microbiology**, v. 206, p. 24-38, 2015.

TAM, P. et al. *Candida glabrata*, friend and foe. **Journal of fungi**, v.1, n.11, p. 277-292, 2015.

TIMKE, M. et al. Identity, beer spoiling and biofilm forming potential of yeasts from beer bottling plant associated biofilms. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 93, n. 2, p. 151-161, 2008.

VAN DER WALT, J.: *Dekkera*, a new genus of the Saccharomycetaceae, n. 1, p. 273-280. 1964.

VAN OEVELEN, D. et al. Microbiological Aspects of Spontaneous Wort Fermentation in the Production of Lambic and Gueuze. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 83, n. 6, p. 356–360, 1977.

VERACHTERT, H.; ISERENTANT, D. Properties of Belgian acid beers and their microflora. Part I. The production of gueuze and related refreshing acid beers. **Cerevisia, Belgian Journal of Brewing and Biotechnology**, v. 20, n. 1, p. 37–41, 1995.

WILLAERT, R. Sugar consumption kinetics by brewer's yeast during the primary beer fermentation. **Cerevisia.**, v.26, p. 43-49, 2001.

ZHENG X.; T. D'AMORE, I. R.; STEWART, G. G. Factors Influencing Maltotriose Utilization During Brewery Wort Fermentations. **Journal of American Society of Brewing Chemists**, v. 52, p. 41–47, 1994.

ZHENG, X. et al. Daqu – A Traditional Chinese Liquor Fermentation Starter. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 117, p. 82-90, 2011.